최신 연구동향

지놈 디자인 기반의 합성효모 개발 연구동향

중앙대학교 생명과학과 유수진, 강현아

1. 개요

생물학은 현재 생물 종들의 유전체로부터 DNA 염기서열의 정보를 해독하는 시대에서 합성 유전체의 시대로 급격한 변화를 겪고 있다. 이러한 변화는 현재 우리에게는 없는, 새로운 수준의 생물학적 지식을 필요로 한다. 그러한 지식은 염기서열이 이미 알려진 세균과 진핵생물의 유전체를 재설계하고 개량하는 합성 유전체학과 유전체 공학을 통해 얻을 수 있다(Annaluru *et al.*, 2015). 합성 유전체학은 1970년 효모의 인공 알라닌 tRNA를 암호화하는 최초의 유전자를 데옥시리보뉴클레오티드로부터 합성한 연구로부터 시작되었다(Agarwal *et al.*, 1970). 그 이후, 특히 지난 10년 간, 다양한 지놈 규모의 조작 기법 등 DNA 합성 기술의 급속한 발전은 대사 경로의 재설계 및 바이러스, 박테리오파아지, 세균의 유전체 조립을 넘어 인공 합성 생물체의 제작까지 가능하게 해왔다(그림 1). 2002년 7.5 kb의 single-stranded RNA로 구성된 poliovirus 유전체의 화학적 합성(Cello *et al.*, 2002), 2005년 유전적 조작이 쉽도록 재설계한 부분적 합성 유전체를 갖는 박테리오파아지 T7의 제작(Chan *et al.*, 2005), 2008년 J Craig Venter 연구소의 약 10년에 걸친 세균 *Mycoplasma genitalium* 전체 유전체(582 kb) 합성(Gibson *et al.*, 2008), 2010년 같은 팀에 의한 1.08 Mb의 합성 유전체를 갖는 세균 *Mycoplasma mycoides* 세포 제작(Gibson *et al.*, 2010)에 이어서 2016년 세포 생존에 필수적인 최소의 유전자 세트만을 갖는, 즉 최소 유전체 세균 JCVI-syn3.0 제작(Hutchison *et al.,* 2016)을 위한 노력들이 계속되고 있다. 한편으로 2013년에 MAGE(multiplex automated genome engineering)와 CAGE(conjugative assembly genome engineering) 기술을 이용하여 확장된 유전 암호를 갖는 재암호화된 대장균 유전체가 제작되어 보고된바 있다(Lajoie *et al.*, 2013).

이러한 합성 유전체학의 발전은 원핵미생물인 세균의 영역을 지나 이제 진핵생물에게도 적용되기 시작하였다. 2007년 Johns Hopkins 대학과 New York 대학의 주도로 단세포 진핵미생물인 효모를 대상으로 전체 합성

유전체를 갖는 최초의 진핵생물 제작 연구가 착수되었다. 본고에서는 전통효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 대상으로 진행되고 있는 지놈 디자인 기반의 합성효모 개발 연구에 대한 배경과 최신동향, 앞으로의 전망에 대해 살펴보았다.

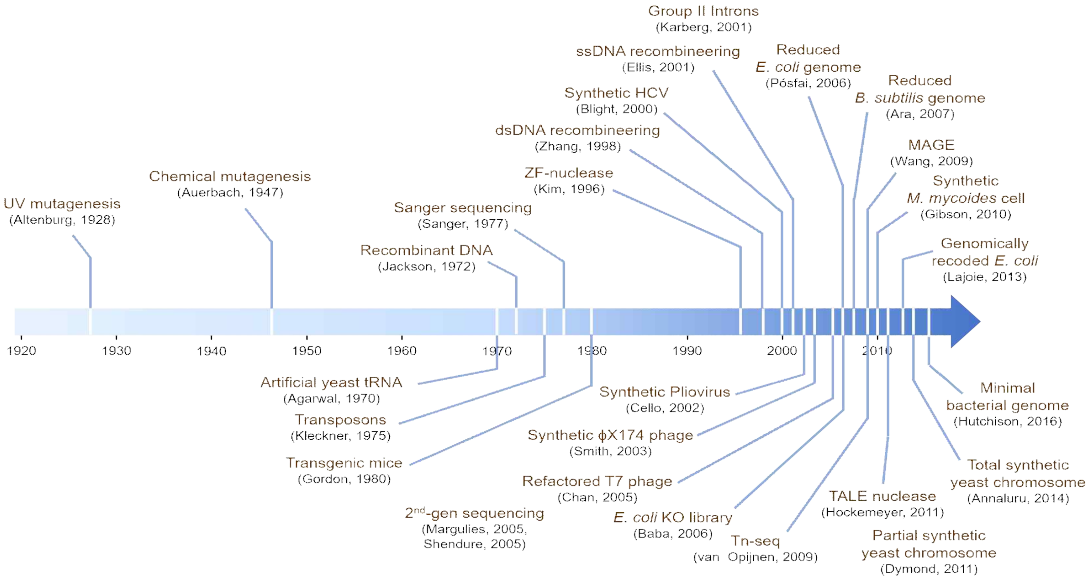

그림 1. 합성 유전체학과 유전체 공학의 발전을 이끈 선두적인 연구들의 연대표(Esvelt and Wang, 2013으로부터 수정·보완함).

2. Synthetic Yeast Genome (Sc2.0) Project

Baker's, brewer's, 또는 budding yeast로 잘 알려진 *S. cerevisiae*는 오랫동안 인류에 의해 이용되어온 가장 오래된 생명공학 산업의 주요 진핵미생물 균주이다. 단세포 진핵미생물인 *S. cerevisiae*는 배양이 쉽고 다루기 용이하며 약 12 Mb의 비교적 작고 안정한 유전체를 지녀 진핵 생물의 유전체가 어떻게 작동하고 진화되어 왔는지 연구하기 위한 모델 생물체로서 널리 쓰이고 있다(Jovicevic *et al.*, 2014). 총 16개의 염색체로 이루어진 *S. cerevisiae*의 유전체 염기서열이 진핵 생물 최초로 1996년에 완전히 해독되었으며(Goffeau *et al.*, 1996), 이를 바탕으로 *S. cerevisiae*는 원핵세포인 세균을 넘어 합성 유전체학의 영역을 확장시킬 수 있는 이상적인 후보로 각광받고 있다.

국제적인 합성 효모 유전체 프로젝트는 2006년 Johns Hopkins 대학에서 휴식 시간에 커피를 마시며 담화를 나누던 Jef Boeke 교수(현재는 New York 대학에 근무)와 Srinivasan Chandrasegaran 교수의 아이디어로부터 출발되었다. 이 프로젝트는 모든 효모 염색체를 단순하게 합성하고 조립

하는 것을 넘어서, 의도적인 염기서열 변화가 도입되도록 정교하게 디자인되어 새로운 연구 방법의 개발 및 생물학적 가설을 검증하는 데 활용할 수 있는 생명공학 재료로서의 합성 유전체를 제작하는 것을 목표로 하고 있다. 2007년부터 시작된 야생형 *S. cerevisiae* version 1.0의 유전체(Sc1.0) 프로젝트는 현재는 지놈의 염기서열 자체를 다시 쓰기 위한 디자인 기반의 synthetic version 2.0(Sc2.0) 프로젝트로 진행되고 있다(그림 2A, http://syntheticyeast.org). Sc2.0은 전례없는 매우 크고 총체적인 합성생물학 프로젝트로서 미국의 Johns Hopkins 대학과 New York 대학, JGI(Joint Genome Institute), GenScript, 중국의 Tianjin 대학과 Tsinghua 대학, BGI(Beijing Genomics Institute), 영국의 Edinburgh 대학과 Imperial college London, 호주의 Macquarie 대학과 싱가포르의 국립대학 등 5개 국가 소속의 대학과 회사의 과학자들로 이루어진 국제적인 팀이 참여하고 있다. *in silico*로 재설계된 각 효모 염색체는 다양한 방법으로 합성 및 조립되는데, 각 참여 대학과 기관들은 하나 이상의 염색체 조립을 담당한다(그림 2B). 특히, 합성 염색체 조립 과정에서 일부 참여 대학의 경우, '유전체 만들기(Build-A-Genome, BAG)' 과목을 수강하는 학부 과정 학생들과 고등학생, 민간 과학자 그룹이 참여한다는 점이 인상적이다(Sliva *et al.*, 2015).

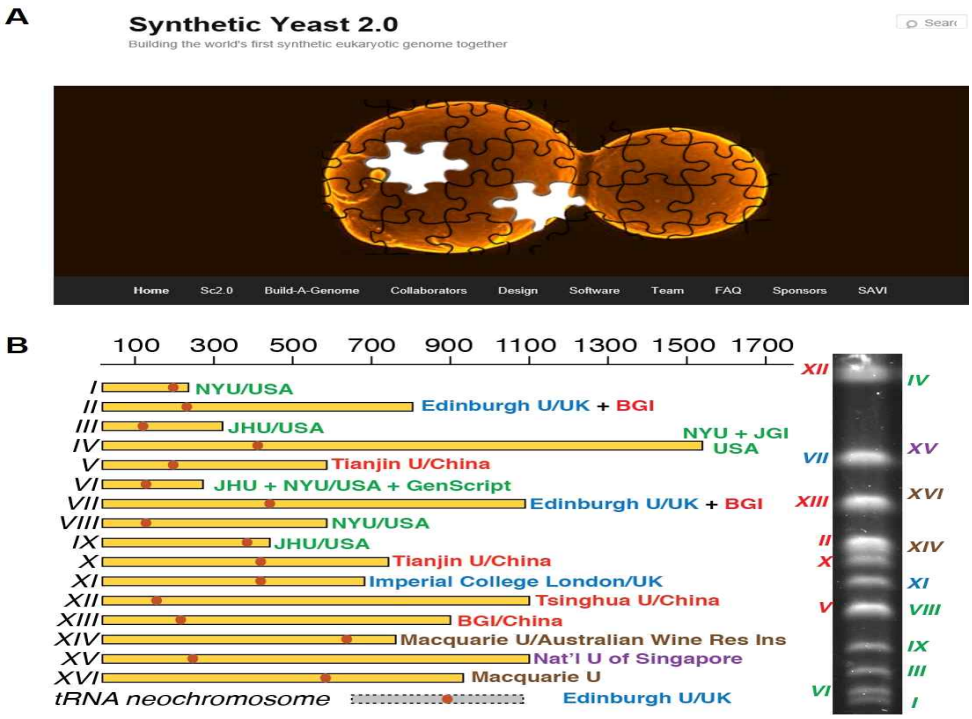

그림 2. Sc2.0 프로젝트. (A)Sc2,0 프로젝트의 웹사이트, (B)각 참여 대학과 기관에 배분된 16개의 *S. cerevisiae* 합성 염색체(http://syntheticyeast.org).

2.1 합성 효모 Sc2.0 유전체 프로젝트의 목표

합성 효모 유전체는 염색체, 유전체 구성, 유전자의 종류, RNA splicing의 기능, 효모 생물학에서 small RNA 역할의 범위, 원핵생물과 진핵생물의 차이 등 매우 다양하고 심오한 생물학적 질문들에 대한 답과 진핵 생물 유전체 구조와 기능의 진화를 이해할 수 있는 단서들을 제시할 수 있을 것이다. 또한 완전한 합성 유전체의 이용가능성은 다른 방법으로는 접근하지 못하는 진화적 의문들에 대한 직접적인 검증을 가능케 할 것이다. 뿐만 아니라, 농업 생산물과 부산물로부터의 에탄올 생산과 같은 넓은 실용성과 함께 산업 발효에 탁월한 개체인 효모가 유전체 재설계와 개량을 거쳐 특정한 기능을 지닌 “지능형 인공 효모”가 된다면 더욱 높은 실용성을 가진 유용한 생물체로 활용될 것이다.

2.2 합성 효모 Sc2.0 염색체의 디자인 전략 및 특징적인 변화

합성 효모는 야생형과 같은 수준의 튼튼함을 지니고 정상적으로 성장할 수 있어야한다. 이것이 Sc2.0에 대한 분명한 최소한의 필요조건이다. 급격하고 많은 변화는 ‘죽은’ 효모를 만들 수 있다. 따라서 오직 적당하고 보존적인 변화만이 포함된다. 합성 효모 유전체를 위한 세 가지 디자인 원리들은 다음과 같다: (1)합성 효모는 야생형의 표현형과 튼튼함을 지녀야 한다; (2)합성 효모에는 합성 유전체를 불안정하게 만들거나 재배열시킬 수 있는 불안정 요소들이 없어야 한다; (3)합성 효모는 추후 연구를 용이하게 하는 유전적 유연성을 가져야한다(Dymond *et al.*, 2011). (1)과 (2)를 만족시키는 동시에 (3)은 “SCRaMbLE"이라는 진화 시스템을 통해 가능해진다.

디자인 변경을 가진 합성 DNA는 단계적인 “bottom up" 접근 방식으로 도입된다. 각 단계에서 만들어지는 생성물은 30-60 kb로 제한되는데, 이 방법의 장점은, 만약 특정 부분이 생존에 영향을 주거나 느린 성장을 초래한다면, 문제를 일으키는 서열과 특징을 밝혀낸 후 그 부분을 다시 합성할 수 있다는 점이다. *S. cerevisiae* 합성 효모 유전체의 기록할 디자인 변경은 다음과 같다. (i)transposon과 sub-telomere 반복 부위과 같은 유전체를 불안정하게 만드는 알려진 모든 요소들의 제거, (ii)Cre 재조합효소의 발현을 유도함으로써 유전체의 요소들이 '뒤섞이게(SCRaMbLE, synthetic chromosome rearrangement and modification by loxP-mediated evolution)' 만들 수 있는 모든 비필수 유전자들 하류로의 대칭적인

(symmetrical) loxP(loxPsym) 재조합 부위의 삽입, (iii)(대장균에 적용했던) 모든 TAG 정지 코돈의 TAA로의 전환, (iv)PCR 증폭으로 합성 유전자인지를 식별할 수 있도록 모든 단백질 암호 서열에 비슷한 염기 변화에 의한 투명무늬 삽입(PCR-표지), (v)16개 염색체로부터 tRNA 유전자 제거 및 '신염색체(neochromosome)'으로의 전위, (vi)효모 유전자에 존재하는 약 250개 인트론 다수의 제거 등이다(Jovicevic *et al.*, 2014)(그림 3).

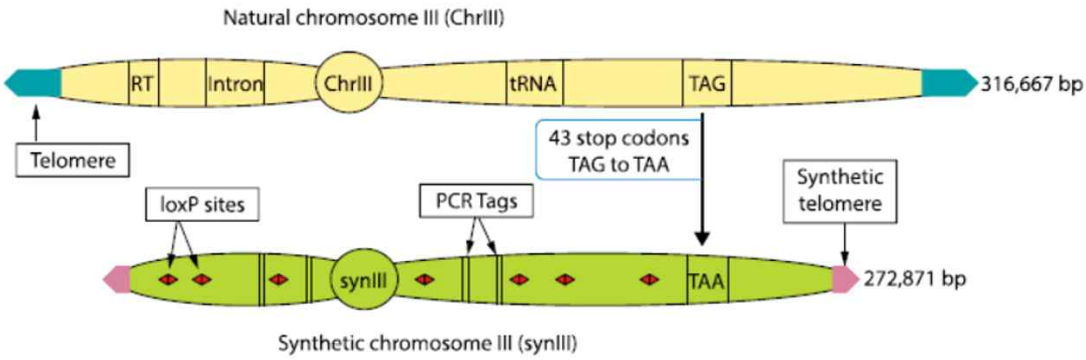

그림 3. 합성 효모 염색체 3번의 디자인 모식도. 21개의 retrotransposon(RT)과 7개 인트론의 제거, 43개 TAG 정지 코돈의 TAA로의 전환, 98개 loxPsym 부위의 도입, 두 개의 자연적인 텔로미어의 더 짧은 보편적인 텔로미어 캡으로의 교체, tRNASer(CGA)를 암호화하는 *SUP61* 및 tRNA 유전자들을 tRNA neochromosome으로 이동 및 PCR-표지들의 도입(Annaluru *et al.*, 2015).

2.3 합성 효모 Sc2.0 염색체의 제작 방법

역사적인 효모 유전체 서열 분석 프로젝트 이후 약 20년이 흐른 2014년에야 최초로 합성된 효모 염색체 3번의 제작이 보고되었다(Annaluru *et al.*, 2014). 가장 짧은 염색체 중 하나인 3번 염색체는 본래 크기가 317 kb이지만, 컴퓨터로 디자인한 3번 합성 염색체는 더욱 축소된 273 kb의 크기를 가졌다. 3번 합성 염색체을 제작하는 계층적인 작업 흐름은 3가지 주요 단계로 구성되었다(그림 4). 첫 번째 단계에서, 약 750 bp의 '집짓기 블록(building blocks, BBs)'이 표준적인 PCR 방법을 통해 서로 겹치는 60-79mer 정도의 올리고뉴클레오티드로부터 생성되고 조립된다. 두 번째 단계에서, 집짓기 블록은 우라실-특이적 절단 반응(uracil-specific excision reaction, USER)(Anaaluru *et al.*, 2012) 또는 *S. cerevisiae* 내에서 상동 재조합 반응에 의한 셔틀 벡터로의 클로닝(Muller *et al.*, 2012) 방법을 이용하여 서로 겹치는 약 2-4 kb 크기의 '미니천크(minichunks)'로 조립된다. 인접한 미니천크들은 약 하나의 집짓기 블록 길이로 서로 포개지도록 설계

되었다. 이는 효모 내에서(*in yeasto*) 상동 재조합 반응에 의한 추가적인 조립을 더욱 용이하게 한다. 마지막 단계에서, 각 반응마다 평균 12개의 미니천크와 교차적인 선택 마커를 이용하여, 11번의 연속적인 형질전환 반응을 통해 *S. cerevisiae* 염색체 3번의 본래 서열을 합성 염색체 3번의 서열로 교체하였다(그림 4).

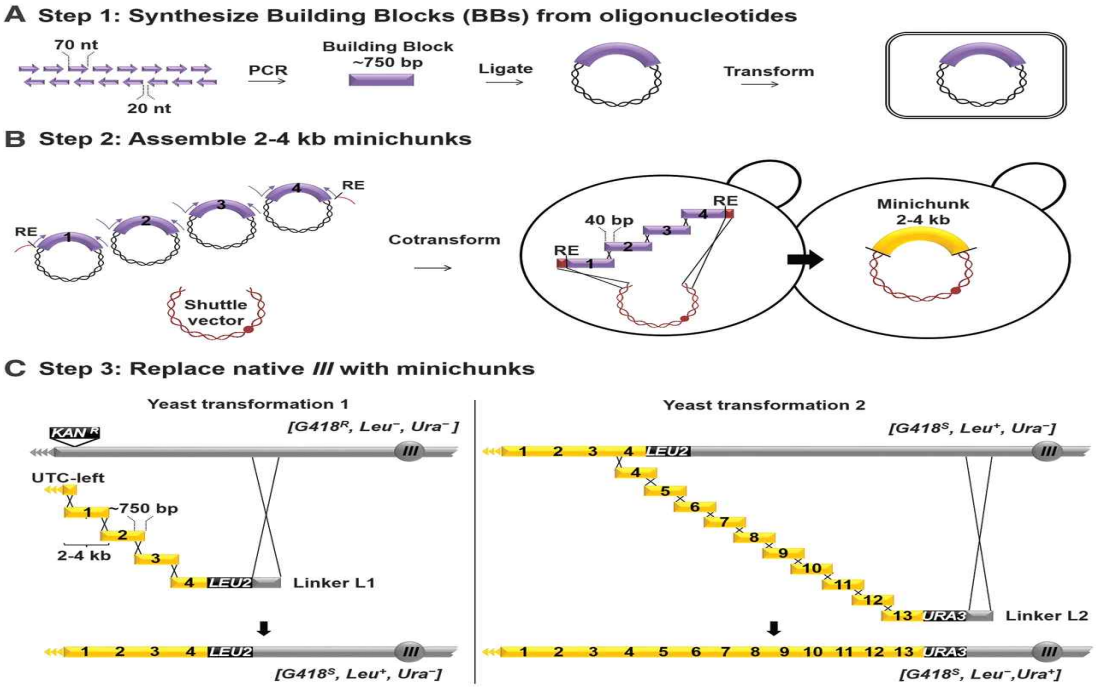

그림 4. 합성 효모 염색체 3번의 제작 과정. (A)집짓기 블록 합성, (B)미니천크의 조립, (C) 합성된 미니천크들을 이용한 합성 염색체와 본래 염색체의 직접적인 교체(Annaluru *et al.*, 2014).

2.4 뒤섞임(SCRaMbLE)에 의한 합성 효모 Sc2.0 유전체의 재배열

합성 효모 유전체에 부가된 가장 재미있고 잠재적 가치를 지닌 특징은 바로 SCRaMbLE 시스템이다. SCRaMbLE 시스템에서는 유도성의 Cre 재조합효소를 이용하여 loxPsym 부위가 도입된 유전체의 부위가 재배열될 수 있다. 원래 박테리오파아지 P1이 자신의 DNA를 세균 숙주에 감염시키기 위한 메커니즘으로 알려진 Cre-Lox 재조합이 발견된 이후, 이 시스템은 특정 부위 재조합 도구로 널리 쓰이게 되었다. Sc2.0 유전체의 염색체는 모든 비필수 유전자 하류에 34 bp 크기의 대칭적인 loxP 부위가 도입된다. 이 크기는 효모가 다수의 loxPsym 서열의 간 고유의 상동 재조합을 일으키는 한계치 이하이기 때문에, loxPsym 서열 간 재조합은 오직 Cre 재조합효소의 발현에만 의존한다(Jovicevic *et al.*, 2014). loxPsym 부위의 대칭성으로 인해 Cre 재조합효소에 의해 두 개의

loxPsym 부위 사이의 DNA가 삽입, 결실, 전위 또는 역위될 수 있다(그림 5).

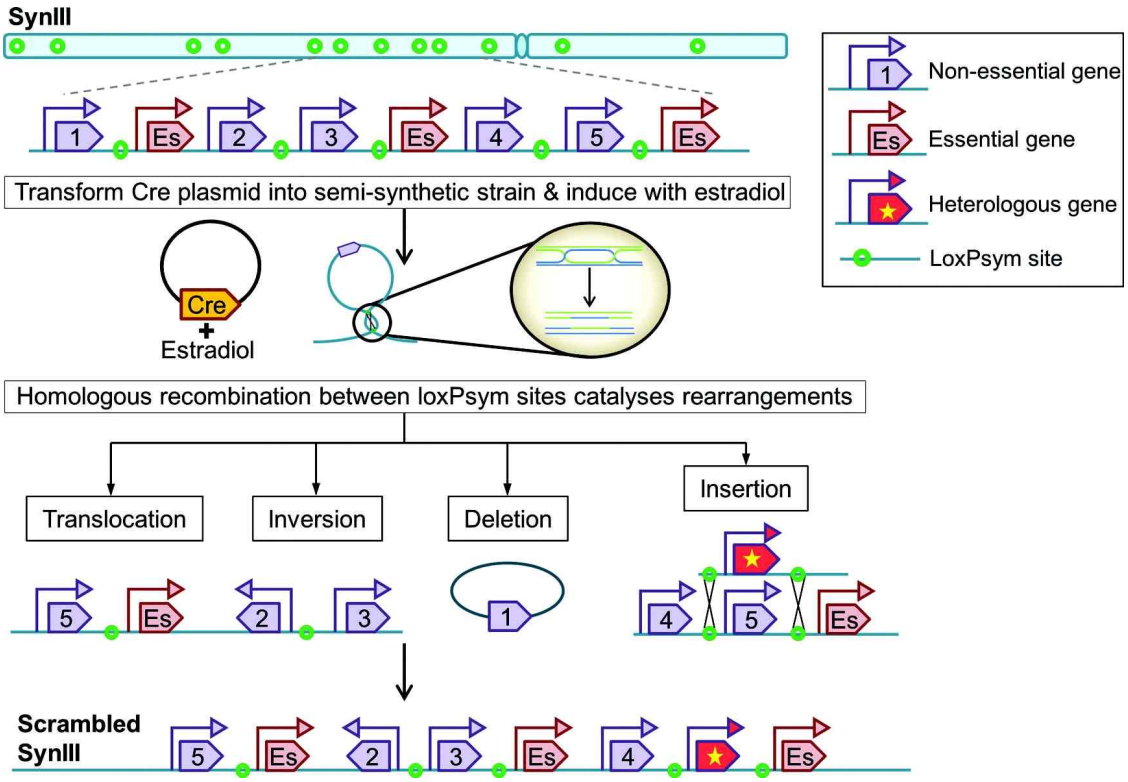

그림 5. 합성 효모의 SCRaMbLE 시스템. 합성 효모 염색체 상의 비필수 유전자들의 하류에 도입된 loxPsym 서열은 Cre-유도의 유전체 DNA의 재조합을 가능하며, 에스트라디올에 의해 발현이 유도되는 Cre 재조합효소는 플라스미스 형태로 제공된다(Jovicevic *et al.*, 2014).

효모 연구에 대한 기존 노력들은 유전체 내의 각 유전자의 역할을 탐구하기 위해 각 유전자를 하나씩 파쇄한 후 각 유전자 쌍을 파쇄해보고 효모의 표현형을 관찰해왔다. 이와 달리, 합성 유전체에 도입된 SCRaMbLE 시스템은 유전자 결실, 역위, 전위 등 10억 개의 서로 다른 조합을 하나의 튜브 안에서 가능하게 하며, 주어진 조건 하에서 경쟁적으로 살아남은 세포만이 회복될 수 있다(Jovicevic *et al.*, 2014). 단 하나의 염색체에서 뒤섞임이 일어나더라도 가능한 재배열의 수는 어마어마하다. 따라서 본질적으로 SCRaMbLE 시스템은 유전체 상의 각각의 유전자의 필요성을 연구하는 동시에, 유전자의 배치와 유전체의 내용물이 어떻게 기능하는지에 대한 연구뿐만 아니라 원하는 특성을 지닌 새로운 유전자를 합성 유전체에 삽입할 수 있는 도구인 셈이다.

2.5 합성 효모 Sc2.0 염색체 제작의 최신 진행 상황

2014년 보고된 기능적인 완전한 합성 효모 염색체 3번은 전체 효모 유전체

의 약 2.5%를 차지한다(Annaluru *et al.*, 2014). 많은 변경 요소들이 도입되었음에도 불구하고 합성 효모 염색체 3번을 가진 synIII 효모 균주 역시 야생형과 비슷한 튼튼함, 콜로니 크기, 세포 모양, 전사체 프로파일을 보였고, 이는 효모 유전체의 높은 유연성을 뒷받침했다. SynIII의 98개 loxPsym 부위에 근거하여 Sc2.0 전체 유전체에는 약 4,000개의 loxPsym 부위가 분포할 것으로 추정된다(Annaluru *et al.*, 2015). 모든 loxPsym 부위가 다른 디자인 변경들과 함께 궁극적으로 Sc2.0 유전체의 안정성과 합성 효모 세포의 생존력에 어떤 영향을 미칠지는 아직 확실하지 않다. SynIII의 결과와 더 많은 염색체의 합성은 우리에게 더 좋은 아이디어를 제시할 것으로 기대되고 있다.

현재 Boeke 교수 연구팀은 합성 효모 염색체 6번(synVI)를 조립하고 있으며, Chandrasegaran 교수 연구팀은 합성 효모 염색체 9번(synIX)의 조립을 완료하는 과정에 있다. SynIII의 합성과 조립으로부터 얻은 경험을 바탕으로, 연구자들은 약 1 Mb의 합성 염색체 제작에는 현재로는 2-3년 정도의 시간이 필요할 것이지만 점차로 제작 속도가 단축될 것으로 예상하고 있다(Annaluru *et al.*, 2015).

3. 결론 및 고찰

합성 효모 Sc2.0 유전체가 완성되었을 때 가장 주목되는 점은 최소 유전체를 가진 진핵 생물(효모)의 출현 가능성이다. 두 개 이상의 유전자가 비슷한 기능을 가진다면, 하나는 제거될 수 있을까? 동시에 효모의 5,000개 이상의 비필수 유전자들의 어떤 조합이 제거될 수 있을까? 효모 세포의 성장에 영향을 주지 않는 최대한의 제거 가능한 비필수 유전자들의 수는 몇 개일까? 등의 진화적인 질문들은 완전한 합성 효모 유전체를 이용하여 직접 검증할 수 있을 것이다. Sc2.0 합성유전체의 가치와 잠재적인 산업적 응용성에 대해 아직 평가할 수는 없지만, 아테미니신(arteminisin)과 모르핀 전구체와 같은 의학적으로 중요한 고부가가치 천연화합물을 생산하는 인공효모 개발에 중요한 섀시(chassis)를 제공할 것이다(Paddon and Keasling, 2014; Galanie *et al.*, 2015). *In vitro* 진화를 거친 Sc2.0 유전체를 가진 '단순화된' 효모 균주가 산업적 분야에 실제적인 유용성을 가져다줄지는 시간이 알려줄 것이다.

또한 매우 중요한 이슈는 거대한 국제적 합성생물학 프로젝트로서 Sc2.0 프로젝트는 공공의 이익을 최대화하는 동시에 잠재적인 위험성은 최소화시키려는 노력을 하고 있다는 점이다. Sc2.0 프로젝트에 참여하는 모든 과학자들은 윤

리와 관리방식에 관한 Sc2.0 성명서에 따르도록 되어있다(Sliva *et al.*, 2015). Sc2.0성명서는 (1)사회적 이익, (2)지적 재산, (3)안전성, (4)관리방식으로 구성된 4가지 측면에서 규정이 제정되었다(표 1). 이러한 자율적 관리(self-regulation) 하에 Sc2.0 프로젝트는 과학적으로 정당할 뿐만 아니라 윤리적으로 건전한 연구가 되도록 추구되고 있으며, 이와 같은 관리 체계는 합성생물학을 앞으로 더욱 전진하게 하는 중요하고 귀중한 모델이 될 것이다.

표 1. 윤리와 관리방식에 관한 Sc2.0 성명서(Sliva *et al.*, 2015)

사회적 이익(Societal benefits)
1. 우리는 인류의 이익을 위하여 Sc2.0 작업을 추구하며 임한다. 2. 우리는 Sc2.0 작업이 투명하게 행해지며 대중에게 열려있도록 약속한다.
지적 재산(Intellectual property)
3. 최종의 Sc2.0과 프로젝트 단계 별로 생성되는 중간 균주들에 대해 지적 재산권은 행해지지 않는다. 4. 이 프로젝트에서 생성되는 모든 자료와 재료들은 다른 연구자들 역시 이용가능하다.
안전성(Safety)
5. Sc2.0에 사용되는 염기서열을 제공하는 모든 회사들은 미국 보건사회복지부의 '합성 이중나선 DNA 제공자를 위한 검사 기본 지침'을 준수해야한다. 6. 프로젝트의 구성원들은 Sc2.0 프로젝트의 자료와 재료가 범죄의 의도로 사용되는 것을 막기 위해 이를 요청하는 개인을 평가해야한다. 7. 우리의 실험실들과 각종 실습, 실험 방법은 연구실 작업종사자들과 단체 밖 지역 사회 모두를 위한 안전 정신을 가진다. 8. 모든 인력들은 반드시 생물 안전, 이중 용도와 그밖에 다른 윤리적 쟁점 등에 관한 훈련을 받아야한다. 9. Sc2.0에 관한 우리의 작업은 국가와 지역 법을 준수한다.
관리방식(Governance)
10. Sc2.0 운영위원회는 이러한 협정의 준수와 안전에 관한 모든 사안을 다룰 것이다. 11. 우리는 가능한 모든 위험성이 반드시 프로젝트의 감독 하에 관리될 수 있도록 프로젝트 단계별로 이 협정을 재논의할 것이다.

결과적으로, 기능적 효모 염색체의 완전한 합성은 진핵생물 합성 생물학에 큰 획을 그은 결과이며, SynIII의 합성은 특별한 디자인 원리를 사용하여 동물 또는 식물의 염색체를 다시 쓰기를 추구하는 미래의 다른 합성 유전체 프로젝트를 위한 길을 닦아 놓았다. Sc2.0 프로젝트와 같은 합성 유전체학 분야의 최근 획기적인 연구들은 진정으로 인간에 의해 만들어진 살아있고 분열하는 합성 세포들을 창조할 수 있는 실제적인 잠재력을 보유한 합성 생물학의 새 시대를 열어놓았다고 평가된다.

참고문헌

1. Agarwal KL, Buchi H, Caruthers MH, et al. (1970) Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. Nature 227: 27-34.

2. Annaluru N, Ramalingam S & Chandrasegaran S (2015) Rewriting the blueprint of life by synthetic genomics and genome engineering. Genome biology 16: 125.

3. Annaluru N, Muller H, Ramalingam S, et al. (2012) Assembling DNA fragments by USER fusion. Methods in molecular biology 852: 77-95.

4. Annaluru N, Muller H, Mitchell LA, et al. (2014) Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. Science 344: 55-58.

5. Cello J, Paul AV & Wimmer E (2002) Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. Science 297: 1016-1018.

6. Chan LY, Kosuri S & Endy D (2005) Refactoring bacteriophage T7. Molecular systems biology 1: 2005 0018.

7. Dymond JS, Richardson SM, Coombes CE, et al. (2011) Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. Nature 477: 471-476.

8. Esvelt KM & Wang HH (2013) Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Molecular systems biology* 9: 641.

9. Galanie S, Thodey K, Trenchard IJ, Filsinger Interrante M & Smolke CD (2015) Complete biosynthesis of opioids in yeast. Science 349: 1095-1100.

10. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, et al. (2008) Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a Mycoplasma genitalium genome. Science 319: 1215-1220.

11. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science 329: 52-56.

12. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, et al. (1996) Life with 6000 genes. Science 274: 546, 563-547.

13. Hutchison CA, 3rd, Chuang RY, Noskov VN, et al. (2016) Design and synthesis of a minimal bacterial genome. Science 351: aad6253.

14. Jovicevic D, Blount BA & Ellis T (2014) Total synthesis of a eukaryotic chromosome: Redesigning and SCRaMbLE-ing yeast. Bioessays 36: 855-860.

15. Lajoie MJ, Rovner AJ, Goodman DB, et al. (2013) Genomically recoded organisms expand biological functions. Science 342: 357-360.

16. Muller H, Annaluru N, Schwerzmann JW, Richardson SM, Dymond JS, Cooper EM, Bader JS, Boeke JD & Chandrasegaran S (2012) Assembling large DNA segments in yeast. Methods in molecular biology 852: 133-150.

17. Paddon CJ & Keasling JD (2014) Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. Nat Rev Microbiol 12: 355-367.

18. Sliva A, Yang H, Boeke JD & Mathews DJ (2015) Freedom and Responsibility in Synthetic Genomics: The Synthetic Yeast Project. Genetics 200: 1021-1028.

19. Synthetic Yeast 2.0 website, http://syntheticyeast.org/